

研究报告

桑黄发酵液中凝集素 SHL24 的分离与生物活性研究

陈建华 孙捷 吕福娇 高国富 赵明文 张克云*

(南京农业大学生命科学学院 江苏 南京 210095)

摘要:【背景】桑黄是一种具有很高药用价值及广泛应用前景的药用真菌，其主要有效成分为多糖。凝集素则是桑黄所含的另一类生物活性物质，具有免疫调节、抗肿瘤及抗菌等作用。【目的】从药用真菌桑黄发酵液中分离纯化凝集素 SHL24，并对其生物活性进行初步探究。【方法】通过冷冻干燥、Sephadex G-50、DEAE Sephadex A-25、MPLC-MonoQ 和 LPLC-Sephadex G-75 等方法，从药用真菌桑黄的发酵液中进行分离纯化；利用 LPLC-Sephadex G-75 和 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定其分子质量；检测不同 pH、金属离子、糖、发酵时间、血红细胞、温度对其凝血活性的影响。【结果】从药用真菌桑黄发酵液中分离到单一蛋白条带，SDS-PAGE 凝胶电泳检测其分子质量约为 24 kD，与分子筛层析法分析的分子质量一致，表明该凝集素为单亚基蛋白。SHL24 可以凝集供试的小鼠血红细胞和 4 种血型人血的血红细胞，但对不同来源的血红细胞凝集程度不同。糖抑制试验表明，SHL24 不被 D-甘露糖、D-麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、树胶醛糖、D-乳糖以及 L-鼠李糖所抑制。热稳定性试验和金属离子对 SHL24 凝血活性影响试验表明 SHL24 具有较好的热稳定性且其凝血活性不受 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 等二价阳离子的影响。【结论】SHL24 具有的理化性质和生物活性，有作为蛋白质药物的潜质。

关键词: 桑黄，凝集素，血凝集活性

Isolation and bioactive characters of a novel lectin SHL24 from the liquid fermentation of *Phellinus baumii*

CHEN Jian-Hua SUN Jie LYU Fu-Jiao GAO Guo-Fu
ZHAO Ming-Wen ZHANG Ke-Yun*

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Background] *Phellinus baumii* is a fungus with a high medicinal value and wide application prospect. The main active ingredient of *Phellinus baumii* is polysaccharide. Besides, lectin is another physiologically active substance which has the functions of immunomodulation, anti-tumor and antibacterial. [Objective] A novel lectin, SHL24, is isolated and purified from the

Foundation item: National Major Science and Technological Special Project for “Significant New Drugs Development” (2009ZX09103-091)

*Corresponding author: Tel: 86-25-84396542; E-mail: keyunzhang@njau.edu.cn

Received: March 22, 2017; Accepted: May 22, 2017; Published online (www.cnki.net): May 31, 2017

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项课题(2009ZX09103-091)

*通信作者: Tel: 86-25-84396542; E-mail: keyunzhang@njau.edu.cn

收稿日期: 2017-03-22; 接受日期: 2017-05-22; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-05-31

liquid fermentation of medicinal fungus *Phellinus baumii* and its bioactivity is studied. [Methods] Sephadex G-50, DEAE Sephadex A-25, MPLC-MonoQ and LPLC-Sephadex G-75 were used to purify this lectin. The molecular mass was determined by SDS-PAGE and LPLC-Sephadex G-75. The effects of different pH, metal ions, sugars, fermentation times, red blood cells, and temperatures on coagulation activity were studied. [Results] SHL24 is a single-subunit protein with the relative molecular weight of 24 kD. SHL24 can agglutinate red blood cells of mouse and human, while it has a variety of activities for different resources of red blood cells. SHL24 cannot be inhibited by D-mannose, D-maltose, dextrose, cane sugars, D-lactose, arabinose and L-rhamnose. SHL24 has good thermal stability and its coagulation activity isn't inhibited by cations, such as Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} . [Conclusion] The stable physical-chemical properties and biological activity of SHL24 make it worth to further study on its pharmacological action.

Keywords: *Phellinus baumii*, Lectin, Hemagglutinating activity

凝集素(Lectin)是一类具有糖专一性和凝集血细胞作用的非免疫来源的蛋白质或糖蛋白,其分子质量为 12–190 kD,含糖量为 0–18%,普遍存在于动植物和微生物中。目前,全世界有 50 多种药用真菌凝集素被纯化,研究发现这些凝集素对细胞的生理具有调节作用^[1-9],有些还具有显著的抗肿瘤作用^[5-9]。

桑黄是珍贵的药用真菌,特指一种只生长于野生桑树上的一个种,产量极低。以前对于它的分类都是比较盲目的,直到 2015 年被重新归类为一个新的属并改科学名为 *Sanghuangporus sanghuang*^[10]。广义的桑黄包括 *Phellinus igniarius*、*P. baumii*、*P. linteus*, 为担子菌亚门(Basidiomycotina)层菌纲(Hymenomycetes)多孔菌目(Polyporales)锈革孔菌科(Hymenochaetaceae)。桑黄作为一种传统中药在东亚国家广泛用于胃肠功能紊乱、降火和淋巴疾病等的治疗^[11]。近年来桑黄中发现了具有显著抑制肿瘤生长和转移作用的活性成分,这些活性成分对人体不良反应小,作为抗癌候选药之一,被人们所关注^[12-14]。桑黄提取物的丰富药理作用还包括抗突变、抑制肝纤维化、抗脂质过氧化作用、增强血单核细胞产生干扰素、抗血管生成作用、降血糖和抗肺炎作用^[15-23]。目前对其研究大多针对桑黄胞内多糖的抗肿瘤作用和刺激免疫作用^[15-21]。

本文报道了从桑黄发酵液中分离出的一种凝集素,对其理化性质和血凝集活性的特点进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

桑黄(*Phellinus baumii*)来源于江苏省农业科学院,小鼠购于大连医科大学实验动物中心,A、B、AB、O 型人血液由本校健康学生提供。

1.2 主要试剂和仪器

丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Tris 和十二烷基磺酸钠(SDS)等化学试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司;低分子量标准蛋白购自宝泰克生物科技有限公司;糖抑制实验中所用的糖均购自 Sigma 公司;实验中所用其它试剂皆为国产分析纯。DEAE Sephadex G-50 和 A-25 购自瑞典 Amersham Bioscience 公司;UV5100 紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司。

1.3 培养基

马铃薯综合培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 蔗糖 25.0, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0^[24]。

1.4 凝集素的分离纯化

1.4.1 样品的采集和粗提液的制备

桑黄接种于马铃薯综合培养基平板上,26 °C 恒温培养至满皿。用直径为 8 mm 的打孔器取菌丝饼 8 块,接种于液体培养基中^[24]。在 25 °C、130 r/min 条件下振荡培养,4 d 后取 3 L 发酵液置于冷冻干燥机中冻干,Tris-HCl (pH 8.0)重溶浓缩成 10 mL,4 °C、8 000 r/min 离心 15 min,取上清得桑黄发酵液凝集素粗提液(SHL)。

1.4.2 Sephadex G-50 凝胶层析

取 DEAE Sephadex G-50 经处理后装柱 (2.6 cm×100 cm), 用 Tris-HCl (pH 8.0)液平衡, 取 SHL 粗提液 10 mL (浓度为 3 mg/mL)上柱, 流速 18 mL/h, 3 mL/tube, 部分收集器收集, UV-1100 紫外可见分光光度计测 A_{280} , 洗脱至 $A_{280}<0.01$ 。收集各峰检测活性^[25-26]。

1.4.3 DEAE Sephadex A-25 离子交换层析

Sephadex G-50 凝胶层析获得的活性峰冻干, 经 Tris-HCl (pH 8.0)透析, 上样于 A-25 纤维素柱 (2.6 cm×30 cm), 上样后先用 Tris-HCl (pH 8.0)平衡一个柱体积, 然后用 NaCl (0-1 mol/L)连续 pH 梯度洗脱。流速为 18 mL/h, 3 mL/tube, 部分收集器收集, 751 型分光光度计测 A_{280} , 洗脱至 $A_{280}<0.01$ 。收集各峰检测活性^[27]。

1.4.4 MPLC-MonoQ 柱离子交换层析

样品用 Tris-HCl (pH 8.0)透析上样后先用 Tris-HCl (pH 8.0)平衡一个柱体积, 然后用 NaCl (0-1 mol/L)连续 pH 梯度洗脱。紫外检测 A_{220} 和 A_{280} , 将活性峰进行收集合并。

1.4.5 LPLC-Sephadex G-75 凝胶层析法测定分子量

层析柱为 1.6 cm×100 cm, 洗脱液为 Tris-HCl (pH 8.0), 流速 30 mL/h, 3 mL/tube。标准蛋白质分子量分别为 97 400、66 200、43 000、31 000、20 100、14 400。 $M=e^{(13.26-0.023V)}$ (M 为分子量, V 为洗脱体积), 取标样(2 mg/mL)和供试样品(2 mg/mL)各 1 mL, 设定 20 μ L 进样量, 记录色谱图^[28]。

1.5 SDS-PAGE 电泳

将从桑黄发酵液中分离收集到的蛋白样进行 SDS-PAGE 电泳, 制作的分离胶浓度为 15%, 浓缩胶浓度为 5%。用考马斯亮蓝 R-250 染色, 所用标准蛋白为兔磷酸化酶 B ($M_w=97\ 400$)、牛血清白蛋白($M_w=66\ 200$)、兔肌动蛋白($M_w=43\ 000$)、牛碳酸酐酶($M_w=31\ 000$)、胰蛋白酶抑制剂($M_w=20\ 100$)和鸡蛋清溶菌酶($M_w=14\ 400$)。

1.6 凝集活性的测定^[29]

测定 SHL24 对鼠、人 A、B、AB 和 O 型血细胞

凝集活性。取新鲜红细胞 200 μ L, 用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5) 0.15 mol/L NaCl 溶液洗涤数次后, 稀释至 10 mL, 制得 2%红细胞悬液。在“V”型血凝板中加入 25 μ L 生理盐水, 取 SHL (1 mg/mL) 25 μ L 作倍比稀释, 每孔加入 2%的血球悬液。稍加振荡后, 静置 30 min 观察结果。

1.7 发酵时间对凝集活性的影响

采集到的桑黄连续 25 °C、130 r/min 培养 7 d, 每隔 24 h 取样 3 L 并分离得到粗提液(SHL), 检测其对血细胞的凝集活性。

1.8 糖抑制试验

根据已经发表的大型真菌凝集素糖特异性的研究结果^[30], 选取 D-甘露糖、D-麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、树胶醛糖、D-乳糖、L-鼠李糖不同糖溶液对 SHL24 血凝活性的影响。方法同血凝试验。SHL24 作倍比稀释, 各孔加入 40 mmol/L 的不同糖溶液, 摇动血凝板使溶液混匀, 室温放置 30 min, 观察结果^[31]。

1.9 pH 对血凝活性的影响

配制 pH 4.0-10.0 的系列缓冲液, 测定不同 pH 条件下的血凝活性。pH 4.0-6.0 时采用 0.015 mol/L 的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液, pH 6.5-7.5 时采用 0.015 mol/L 的磷酸盐缓冲液, pH 8.0-9.0 时采用 0.015 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0-10.0 时采用 0.015 mol/L 的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液^[32-33]。

1.10 金属离子对凝血活性的影响

在“V”型血凝板上, 将在 20 mmol/L EDTA- Na_2 中充分透析后的 SHL24 溶液中分别加入 10 mmol/L 的 CaCl_2 、 MgCl_2 和 ZnCl_2 , 检测其对小鼠血细胞凝血活性的影响^[34]。

1.11 热稳定性试验

将浓度为 1 mg/mL 凝集素样品分成若干份, 分别在 40-100 °C 下温育 30 min, 迅速冷却至室温, 在“V”型血凝板上检测对小鼠血红细胞的凝集活性^[35]。

2 结果与分析

2.1 桑黄发酵液中凝集素的分离纯化

凝集素的粗提液经过冷冻干燥后利用 Sephadex G-50 柱(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0)分离

纯化,洗脱后得到 3 个洗脱峰 G1-G3 (图 1),活性检测表明 G2 为活性峰。G2 峰再经 Sephadex A-25 离子交换层析得到 A1 和 A2 峰(图 2),活性检测 A2 为活性峰。A2 经 MonoQ 柱离子交换层析,得到 6 个峰 M1-M6 (图 3),其中 M6 为活性峰;M6 再经 LPLC-Sephadex G-75 分子筛凝胶层析得 2 个峰 L1 和 L2 (图 4),活性检测 L2 为活性蛋白峰。最终分离得到所需的活性蛋白 SHL24。记录图 4 中的标样和供试样品的洗脱体积,并以标样的洗脱体积建立分子量的标准曲线。根据供试样品的洗脱体积,得到 SHL24 的相对分子质量约为 24 kD。

2.2 SDS-PAGE 垂直板型凝胶电泳

SDS-PAGE 垂直板型凝胶电泳结果表明,L2 为纯品,由一个亚基组成,相对分子质量在 20.1-31.0 kD 之间(图 5)。这与凝胶层析法测定的相对分子质量约 24 kD 相一致。

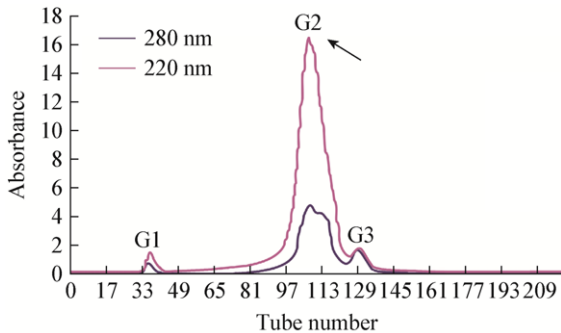


图 1 Sephadex G-50 凝胶层析结果
Figure 1 Results of Sephadex G-50 gel filtration chromatography

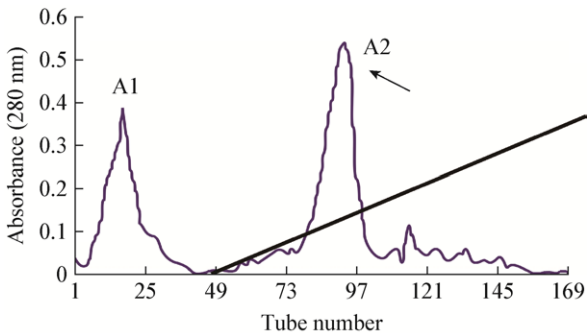


图 2 Sephadex A-25 离子交换层析结果
Figure 2 Results of Sephadex A-25 ion-exchange chromatography

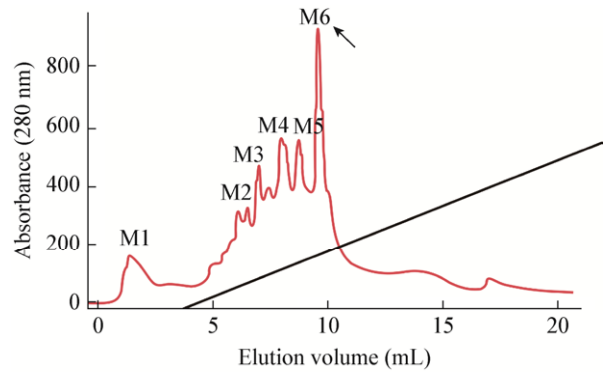


图 3 MPLC-MonoQ 柱离子交换层析结果
Figure 3 Results of MPLC-MonoQ column ion exchange chromatography

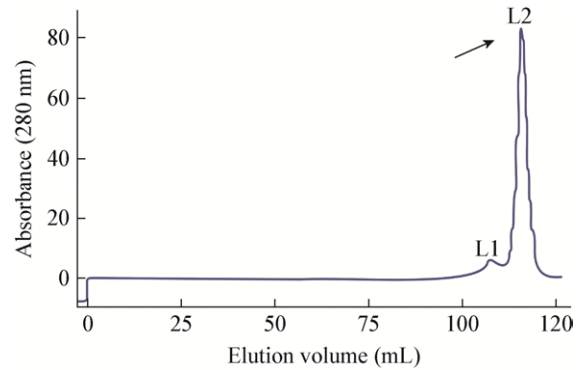


图 4 LPLC-Sephadex G-75 分子筛凝胶层析结果
Figure 4 Results of LPLC-Sephadex G-75 molecular sieve gel chromatography

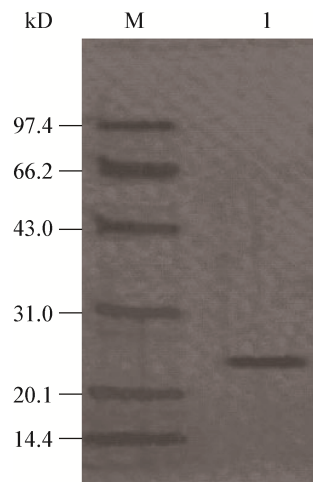


图 5 凝集素 SHL24 的 SDS-PAGE 垂直板型凝胶电泳
Figure 5 Vertical plate in SDS-PAGE gel electrophoresis of SHL24

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 凝集素 SHL24。
 Note: M: Protein marker; 1: The lectin of SHL24.

2.3 对各种血细胞凝集活性的测定

在凝集活性测定试验中,静置观察 30 min 期间,SHL24 对鼠红细胞、人 A、B、AB 以及 O 型血细胞均能发生凝集反应,其中对 AB 型血细胞凝集效果最好,发生凝集的时间最短。

2.4 发酵时间对凝集活性的影响

在连续摇瓶培养 7 d 过程中,每隔 24 h 取样 3 L 分离 SHL 粗提液,发现不同发酵时间的桑黄发酵液对血液的凝集活性具有差异(表 1)。测定结果表明培养 120 h,即第 5 天时粗提液血凝活性最强,说明随着培养时间的增加,发酵液中所产生的 SHL24 的量在逐渐增加并趋于饱和,且随着发酵时间的推移发酵液中的发酵产物对 SHL24 的凝集活性具有抑制作用,可能导致其失活。

表 1 桑黄发酵液发酵时间对 SHL24 凝集活性的影响

Table 1 Effect of fermentation time on hemagglutination vitality (mg/mL)

时间 Time (d)	0.05	0.5	0.1	1
3	-	-	+	++
4	-	+	++	+++
5	+	+	++	+++
6	-	+	++	+++
7	-	-	-	+

注: -: 无凝血活性; +: 有凝血活性,加号越多表示凝血活性越强。

Note: -: Negative hemagglutination activity; +: Positive hemagglutination activity; The more +, the stronger hemagglutination activity is.

表 2 温度对 SHL24 血凝活力的影响

Table 2 Effect of temperature on hemagglutination vitality

温度 Temperature (°C)	原液 Original fluid	2 倍稀释 2-Fold dilution	4 倍稀释 4-Fold dilution	8 倍稀释 8-Fold dilution	16 倍稀释 16-Fold dilution
40	++	++	+	+ -	-
50	++	++	+	+ -	-
60	++	++	+	+ -	-
70	++	++	+	+ -	-
80	++	++	+	+ -	-
90	++	+	+ -	+ -	-
100	++	+	+ -	- -	-

注: -: 无凝血活性; +: 有凝血活性,加号越多表示凝血活性越强。

Note: -: Negative hemagglutination activity; +: Positive hemagglutination activity; The more +, the stronger hemagglutination activity is.

2.5 糖抑制试验

在糖抑制试验中,加入树胶醛糖、D-麦芽糖、D-甘露糖、蔗糖、L-鼠李糖、D-乳糖以及葡萄糖后检测 SHL24 对血红细胞的凝集作用,结果显示试验组与不加糖的对照组均能使血红细胞发生凝集作用且发生凝集现象的时间无明显差异,表明 SHL24 具有良好的稳定性。

2.6 pH 对 SHL24 血凝活力的影响

试验结果显示 SHL24 在弱酸、中性和弱碱环境下均能对血红细胞起到血凝作用。pH 为 5.0、6.0 和 9.0 时血凝活性不强;pH 小于 5.0 和大于 9.0 时无血凝活性;pH 为 7.0 和 8.0 时血凝活性最强。说明强酸、强碱环境下可使 SHL24 丧失血凝活性。

2.7 金属离子及 EDTA 对 SHL24 凝血活性的影响

SHL24 经过 EDTA 透析后,其凝血活性没有发生变化。在透析后的溶液中分别加入 10 mmol/L CaCl₂、MgCl₂、ZnCl₂,其凝血活性也没有明显变化,说明 SHL24 凝血活性不受二价金属离子 Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺及 EDTA 的影响,对二价金属阳离子具有很好的稳定性。

2.8 温度对 SHL24 血凝活力的影响

在 40-100 °C 条件处理下,检测不同浓度 SHL24 对血红细胞的血凝活性。SHL24 原液在 8 倍稀释时仍具有部分血凝活性,且其原液对温度变化表现出相当高的稳定性,基本不受温度的影响(表 2)。

3 讨论与结论

凝集素是通过与细胞表面特异性的糖基结合进而引发其凝集效应。本研究对从桑黄发酵液中分离纯化得到的一种凝集素 SHL24 进行凝集活性的测定,发现 SHL24 对不同类型的血细胞凝集能力有差异:对人 AB 型血细胞的凝集速度比鼠血细胞和人 A、B 和 O 型血细胞快。说明 SHL24 所识别的专一性的糖基在这些细胞中都是存在的,且在这几类细胞表面所具有的专一性糖基受体的数目、结合的构型以及糖结合的强度具有一定的差异,导致 SHL24 对几种血细胞凝集速度的变化。

凝集素具有可逆的糖结合特异性,凝集活性可以被单糖或寡糖所抑制,因为糖结合了凝集素肽链中的活性位点而抑制其与红细胞结合的能力^[36]。本实验用不同的糖对 SHL24 进行处理,结果表明树胶醛糖、D-麦芽糖、D-甘露糖、蔗糖、L-鼠李糖、D-乳糖以及葡萄糖等几种单糖和双糖对其并无抑制作用,说明从桑黄发酵液中提取的凝集素 SHL24 与一些已知的凝集素相比,具有较强的位点专一性和稳定性。如从金针菇和灵芝中分离的凝集素均能被 D-果糖和木糖所抑制^[37];从香蕉果肉中分离的香蕉凝集素 Banlec1 能被 D-麦芽糖、葡萄糖、D-甘露糖、D-果糖抑制^[38];从刀豆中分离的凝集素 ConA 被葡萄糖与 D-甘露糖强烈的抑制,鼠李糖、蔗糖、D-麦芽糖对其均有部分抑制作用^[39]。可见大部分的凝集素均能被一种或两种不同的单糖或双糖不同程度地抑制,而 SHL24 却不受实验过程所列的 7 种糖的抑制,位点专一性很高,其具体被何种糖抑制还有待于进一步研究。

本实验在对 SHL24 的热稳定性、pH 和二价金属阳离子的研究中也显示出了高度稳定性。并且桑黄与其它药用菌相比,具有许多药用功效,是一种很有发展前景的药用菌,许多从桑黄子实体或菌丝体中分离到的小分子和多糖类物质具有调节寄主的免疫活性和抗肿瘤作用^[40-42],而凝集素则是食用菌中所含的另一类生理活性物质,部分已分离的食用菌凝集素具有很强的抗肿瘤活性。随着

人们生活水平的提高和对健康的关注,人们越来越倾向于通过进食“药食同源”的食物来进行疾病的预防和治疗。目前从食用菌中分离的凝集素也越来越多,如 1994 年, Kawagishi 等从猴头菌里分离得到的凝集素在 pH 为 5.0–10.5,温度在 70 °C 以下能够保持稳定,且凝集活性不受金属离子的影响^[43];2006 年,林玉满等从桔斑玉蕈子实体中分离的凝集素对热较不稳定,40 °C 以下稳定,60 °C 则全部失活,在 pH 5.0–8.0 的范围内凝集活性较高^[44]。2014 年, Rouf 等从小脆柄菇(*Psathyrella asperospora*)的蘑菇里提取到的凝集素在 55 °C 以下, pH 6.0–10.0 的条件下十分稳定,温度再高将逐渐失去活性^[45]。与此相比,本研究中的 SHL24 凝集素在温度为 100 °C,30 min 内, pH 为 5.0–9.0 均表现出高度稳定性,且不受普通的二价金属阳离子 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 及 EDTA 的影响。尤其是 SHL24 具有的耐高温性,可推测其多肽中二硫键的数目较多或其主要的活性位点为糖链而不是肽链。SHL24 具有的这些稳定的理化性质和生物活性为进一步探索其在药用真菌桑黄中的作用奠定了基础。

因此,本文对桑黄发酵液凝集素的研究,不仅开辟了凝集素的新来源,而且为其开发应用提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] Rana T, Bera AK, Bhattacharya D, et al. Characterization of arsenic-induced cytotoxicity in liver with stress in erythrocytes and its reversibility with *Pleurotus florida* lectin[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2015, 31(2): 108-122
- [2] Kobayashi Y, Tateno H, Dohra H, et al. A novel core fucose-specific lectin from the mushroom *Pholiota squarrosa*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(41): 33973-33982
- [3] Li DT, Cui TJ, Lü O, et al. Isolation, purification and properties of lectin from *Ulva pertusa*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 16(6): 773-778 (in Chinese)
李丹彤, 崔铁军, 吕欧, 等. 孔石莼(*Ulva pertusa*)凝集素的分离纯化及性质的研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(6): 773-778
- [4] Sun H, Zhao CG, Tong X, et al. Purification and characterization of a novel lectin AAVP from fruiting bodies of the Edible Fungus, *Agrocybe aegerita*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 19(1): 96-102 (in Chinese)
孙慧, 赵辰光, 全鑫, 等. 一种新杨树菇(*Agrocybe aegerita*)

- 凝集素的纯化及生化特性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(1): 96-102
- [5] Jiang S, Chen YJ, Wang M, et al. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine[J]. Biochemical Journal, 2012, 443(2): 369-378
- [6] Li Y, Zhang G, Ng TB, et al. A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *hericium erinaceum*[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 2010(6): 716515
- [7] Ren G, Zhou CX, Xiao CQ, et al. Progress on antineoplastic constituents derived from polypore fungi[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2008, 33(12): 1377-1380 (in Chinese)
任刚, 周长新, 肖昌钱, 等. 源于多孔菌的抗肿瘤活性成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12): 1377-1380
- [8] Ngai PHK, Ng TB. A mushroom (*Ganoderma acapense*) lectin with spectacular thermo-stability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 314(4): 988-993
- [9] Zhao CG, Sun H, Tong X, et al. An antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*[J]. Biochemical Journal, 2003, 374(2): 321-327
- [10] Zhou LW, Vlasák J, Decock C, et al. Global diversity and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex (Hymenochaetales, Basidiomycota): *Sanguangporus* gen. nov. *Tropicoporus excentrodendri* and *T. guanacastensis* gen. et spp. nov. and 17 new combinations[J]. Fungal Diversity, 2016, 77(1): 335-347
- [11] Cho JH, Cho SD, Hu HB, et al. The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(7): 1163-1169
- [12] Ding XH, Wen CP, Ding ZS, et al. Liquid fermentation of *Phellinus igniarius* for production of polysaccharide[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2012, 43(5): 906-909 (in Chinese)
丁兴红, 温成平, 丁志山, 等. 药用真菌桑黄液体发酵生产多糖工艺条件研究[J]. 中草药, 2012, 43(5): 906-909
- [13] Guo W, Dong WL, Li KX. The effect of *Phellinus Linteus* and *coriolus versicolor*capsule in lifetime of tumor-bearing mice[J]. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine, 2010, 29(1): 45-47 (in Chinese)
郭炜, 董文亮, 李坤星. 桑黄云芝胶囊对荷瘤小鼠生存期的影响[J]. 山东中医杂志, 2010, 29(1): 45-47
- [14] Kim GY, Lee JY, Lee JO, et al. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(5): 1218-1226
- [15] Yayeh T, Oh WJ, Park SC, et al. *Phellinus baumii* ethyl acetate extract inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokine expression in RAW264.7 cells[J]. Journal of Natural Medicines, 2012, 66(1): 49-54
- [16] Xue Q, Sun J, Zhao MW, et al. Immunostimulatory and anti-tumor activity of a water-soluble polysaccharide from *Phellinus baumii* mycelia[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1017-1023
- [17] Yan JK, Ma HL, Zhu ZP, et al. Physico-chemical properties and antioxidant activity *in vitro* of intracellular polysaccharides from *Phellinus igniarius*[J]. Food Science, 2012, 33(9): 36-40 (in Chinese)
闫景坤, 马海乐, 祝子坪, 等. 桑黄菌胞内多糖的理化性质和体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 36-40
- [18] Xie LY, Zhang Y, Guo Y, et al. Isolation, purification and physico-chemical characteristics analysis of mycelial polysaccharides from *Phellinus baumii*[J]. Food Science, 2011, 32(5): 143-147 (in Chinese)
谢丽源, 张勇, 郭勇, 等. 桑黄菌丝体多糖的分离纯化及理化性质分析[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 143-147
- [19] Shen XX, Yang Y, Zhang JS, et al. Isolation, purification and immunomodifying activity of polysaccharides from *Phellinus igniarius*[J]. Acta Edulis Fungi, 2008, 15(2): 31-36 (in Chinese)
沈学香, 杨焱, 张劲松, 等. 桑黄多糖的分离纯化及体外免疫活性的研究[J]. 食用菌学报, 2008, 15(2): 31-36
- [20] Zhang M, Ji XG, Bei ZC, et al. Studies on the anti-tumor activity of *Phellinus linteus*[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2006, 22(3): 56-58 (in Chinese)
张敏, 纪晓光, 贝祝春, 等. 桑黄多糖抗肿瘤作用[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3): 56-58
- [21] Yang Q, Zhang H, Wang Q, et al. Anti-tumor effect of exopolysaccharide from *Phellinus igniarius*[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2007, 30(3): 188-190 (in Chinese)
杨全, 张卉, 王琦, 等. 桑黄胞外多糖抗肿瘤活性研究[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30(3): 188-190
- [22] Che HL, Meng FY, Du J, et al. Effect of extract from *Phellinus igniarius* on tumor growth and cell immunity function[J]. Chinese Journal of Public Health, 2005, 21(1): 79-81 (in Chinese)
车会莲, 孟繁岳, 杜杰, 等. 桑黄提取物对肿瘤生长和细胞免疫功能的影响[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(1): 79-81
- [23] Zhang WG, Hu JH. Prophylactic effect of *Phellinus igniarius* on hepatic fibrosis in rats[J]. Pharmaceutical Care and Research, 2002, 2(2): 82-84 (in Chinese)
张万国, 胡晋红. 桑黄预防大鼠肝纤维化作用的实验研究[J]. 药学服务与研究, 2002, 2(2): 82-84
- [24] Li CC, Wei YX, Guo LZ. Preliminary study on liquid fermentation medium of *Phellinus igniarius*[J]. Edible Fungi of China, 2009, 28(2): 46-48 (in Chinese)
李翠翠, 尉玉晓, 郭立忠. 桑黄液体发酵培养基优化的初步研究[J]. 中国食用菌, 2009, 28(2): 46-48
- [25] Song YJ, Cui TJ, Li DT, et al. Isolation, purification and characterization of lectin from *Enteromorpha intestinalis*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2005, 24(1): 1-5 (in Chinese)
宋玉娟, 崔铁军, 李丹彤, 等. 肠浒苔凝集素的分离纯化及性质研究[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(1): 1-5
- [26] Wang Z. Purification and partial characterization of seed lectins

- from *Robinia pseudoacacia* L.[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2004 (in Chinese)
- 王臻. 刺槐种子凝集素的分离纯化和部分性质研究[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2004
- [27] Song YJ, Cui TJ, Li DT, et al. Isolation, purification and characterization of lectin from *Gloiopeltis furcata*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(2): 167-172 (in Chinese)
- 宋玉娟, 崔铁军, 李丹彤, 等. 海萝凝集素的分离纯化及性质[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 167-172
- [28] Liu CP. Isolation, purification and properties of lectin from infected *Apostichopus japonicus* by two kinds of pathogens[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2008 (in Chinese)
- 刘翠萍. 刺参(*Apostichopus japonicus*)感染两种病原菌前后体内凝集素的分离纯化与性质研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2008
- [29] Qin XZ, Yang XP, Chen J, et al. Hemagglutinins of higher fungi in Altay[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2016, 53(1): 142-148 (in Chinese)
- 秦新政, 杨新平, 陈竟, 等. 26 种阿勒泰大型真菌凝集素研究[J]. 新疆农业科学, 2016, 53(1): 142-148
- [30] Singh SS, Wang HX, Chan YS, et al. Lectins from edible mushrooms[J]. Molecules, 2014, 20(1): 446-469
- [31] Li DT, Song L, Zhong L, et al. Isolation, purification and properties of lectin from *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(5): 654-658 (in Chinese)
- 李丹彤, 宋亮, 钟莉, 等. 刺参凝集素的分离纯化及其性质[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 654-658
- [32] Li DT, Zhou XR, Zhong L, et al. A Galactose-specific lectin isolated from Green Alga *Monostroma nitidum* Wittr[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(3): 257-263 (in Chinese)
- 李丹彤, 周晓茹, 钟莉, 等. 从绿藻礁膜(*Monostroma nitidum* Wittr)分离半乳糖专一的凝集素[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(3): 257-263
- [33] Li DT, Wu ZH, Li Y, et al. Purification, properties and chemical modification of tryptophan residues in lectin from coelomic fluid of sea urchin *Glyptocidaris crenularis*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2012, 27(4): 338-343 (in Chinese)
- 李丹彤, 吴振海, 李悦, 等. 海刺猬体腔液凝集素的纯化、性质及其色氨酸的化学修饰[J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(4): 338-343
- [34] Lin YM, Su AH. Purification and characterization of the lectin from *Dictyophora echinovolva*[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2004, 13(3): 1-6 (in Chinese)
- 林玉满, 苏爱华. 棘托竹荪凝集素的纯化及其生化特性[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 1-6
- [35] Zhang CY. Purification and characterization of a novel lectin from the medicinal fungus *Ganoderma applanatum* in Changbai Mountain[D]. Changchun: Master's Thesis of Northeast Normal University, 2005 (in Chinese)
- 张春玉. 长白山药用真菌树舌凝集素的分离纯化及生化特性[D]. 长春: 东北师范大学硕士学位论文, 2005
- [36] Ho JCK, Sze SCW, Shen WZ, et al. Mitogenic activity of edible mushroom lectins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2004, 1671(1/3): 9-17
- [37] Guo D, Pan FF, Pan Y, et al. Extractions and activities determinations of lectins from five mushrooms[J]. Journal of Anhui Science and Technology University, 2014, 28(3): 35-40 (in Chinese)
- 郭栋, 潘芳芳, 潘煜, 等. 五种食用菌凝集素的提取及凝集活性测定[J]. 安徽科技学院报, 2014, 28(3): 35-40
- [38] Li H. Prokaryotic expression and characterization of banlec1 in *Escherichia coli*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- 李欢. 香蕉凝集素 BanLec1 的原核表达及活性分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- [39] Chen JY. Study on the extraction, purification and characterization of lectin from the *Canavalia ensiformis* seed[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2008 (in Chinese)
- 陈婧宜. 刀豆凝集素提取分离纯化及性质研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2008
- [40] Adamová L, Malinová L, Wimmerová M. New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy[J]. Microscopy Research and Technique, 2014, 77(10): 841-849
- [41] Hong CE, Park AK, Lyu SY. Synergistic anticancer effects of lectin and doxorubicin in breast cancer cells[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 394(1): 225-235
- [42] Mukherjee S, Zheng H, Derebe MG, et al. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin[J]. Nature, 2014, 505(7481): 103-107
- [43] Kawagishi H, Mori H, Uno A, et al. A sialic acid-binding lectin from the mushroom *Hericiium erinaceum*[J]. FEBS Letters, 1994, 340(1/2): 56-58
- [44] Lin YM, Su AH. Partial properties and haemagglutination activity analysis of the lectin from *Hypsizygus marmoreus*[J]. Mycosystema, 2006, 25(2): 284-291 (in Chinese)
- 林玉满, 苏爱华. 斑玉蕈 *Hypsizygus marmoreus* 凝集素的部分性质和细胞凝集活性分析[J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 284-291
- [45] Rouf R, Stephens AS, Spaan L, et al. G₂/M cell cycle arrest by an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from *Psathyrella asperspora*[J]. Glycoconjugate Journal, 2014, 31(1): 61-70